

201220014A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清野 透

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	-----	1
ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究		
清野 透		
II. 分担研究報告	-----	13
1. HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究		
清野 透		
2. HPV治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究		
川名 敬		
3. HPVがん蛋白質の機能解析並びにウイルス増殖機構の解析		
酒井 博幸		
4. 交叉性中和抗体による HPV 中和の分子機構の解明と		
中和活性測定法の確立		
森 清一郎		
5. ナノミセルをもちいたHPVをターゲットとする新規治療法の開発		
中川 俊介		
6. 子宮頸部高度異型上皮に対するRNAi治療開発に関する研究		
大和 建嗣		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	51

I 総括研究報告書

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

清野 透

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括）・分担）研究報告書

ヒトパピローマウイルスを標的とする発がん予防の研究

研究代表者 清野 透 国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野 分野長

研究要旨 子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。HPV 型間で共通性の高い L2 蛋白質を抗原としてもつ第二世代 HPV 感染予防ワクチンは、武田薬品工業による事業化を受け、大規模臨床試験に必要な簡便な HPV 抗体価測定法として VLP-ELISA 法を開発した。HPV16 E7 を抗原とし CTL 誘導と CIN3 病変の治療を目指した経口治療ワクチン (GLB101c) の探索的 I/IIa 相臨床試験を 3 年間にわたり実施し終了した。最大有効量 (1g/日) における CIN3 から CIN2 への退縮と手術の回避例が 80% (8/10) で得られ、退縮後の CIN3 への増悪も観察されていない。CTL の誘導と病理組織像の改善との間には相関が見られた。HPV ゲノムを複製維持する細胞株を樹立しゲノム内にレポーター遺伝子を搭載することで複製阻害剤のハイスループット スクリーニングも可能な細胞株樹立法を開発した。HPV 感染機構の解析や、正確な中和活性評価に必要な本物の HPV 粒子を 3 次元培養法により少量調製し用いた。単層培養細胞を用いた HPV 粒子産生法の開発にも目途が立った。

A. 研究目的

ウイルスが原因となるがんは、ウイルス感染や持続感染を阻害すれば予防できる。HPV はほぼ全ての子宮頸がんの原因であり、全がんの 5%、女性のがんの 11%の原因となっている。発がん性 HPV 群の感染予防、HPV 潜伏感染の阻止、前がん病変の排除等による子宮頸がんの予防法を開発し子宮頸がんの罹患率・死亡率を減少させることが研究の目的である。特色としてウイルス遺伝子あるいは蛋白質を分子標的とし、副作用が少なく特異性の高い予防法・治療法の開発が期待される。

現行の HPV ワクチンは 16、18 型にしか効果がないが、先行研究である神田班の成果として開発された第

2 世代 HPV ワクチンは発がん性 HPV 群すべての感染予防が期待できる。また、同グループが開発した中和抗体定量系は、世界で最も信頼性が高く、HPV 感染の実態を調べる血清疫学、ワクチン臨床試験のデータ解析に応用できる。これらの特色を生かし第 2 世代 HPV 感染予防ワクチンの実用化を目指す。

感染予防ワクチンは気感染者に対しては無効であるため異なる戦略が必要である。E7 蛋白質を表面に持つ乳酸菌製剤を経口ワクチンとして投与し、粘膜 CTL 誘導によって前癌病変の治療を試みる臨床試験は、世界に類を見ない試みである。本治療ワクチンは安価な製剤化が可能で安全性も高いことが予想され有効性が確

認できれば、実用化が容易である。

細胞DNA合成と連動してHPVゲノムの複製が起る培養細胞系を、HPV潜伏感染のモデルとして用い、その分子機構を解析し、標的とすべきウイルス遺伝子・蛋白質を明確にする。ウイルスがコードする唯一の複製関連蛋白であるE1ヘリカーゼを標的とした治療法は期待されていたが、研究代表者らは、HPVゲノムの維持複製にはE1ヘリカーゼが不要であることを証明し、異なるアプローチによる複製阻害剤の開発が必要であることを示した。これに基づき、また、HPV複製阻害剤のハイスループット・スクリーニング系の開発を進める。

一方、研究代表者は正常子宮頸部角化細胞の培養、不死化と、前がん病変からがん化に至る過程を培養細胞系で忠実に再現することに成功している。正常子宮頸部からCIN、子宮頸がんに相当する細胞を三次元（ラフト）培養することで臨床病変に近い状態を再現することができ、低分子化合物、siRNA、プロテオソーム阻害剤などの効果をin vitroで検討することができる。独自のsiRNA設計プログラムに基づくHPV遺伝子に対するsiRNAは分担研究者が国際特許を有している。更に、研究協力者が開発した最新のナノ粒子ミセルDDSを用い、これらの局所投与効果の評価法を確立する。これらの基礎研究より子宮頸がん予防のための新たなシーズを開拓する。

B. 研究方法

全ての型の高リスク型HPVの感染予防を目指す第二世代HPVワクチン開発が2010年10月より武田薬品工業により事業化されることが決定されている。実用化を促進するために有効性を示す科学的根拠の蓄積と有効性を評価するための技術開発を進める。ワクチン抗原により誘導される中和抗体の中和エピトープを解析し、抗原呈示法の改良を進める。大規模臨床試験に必要な交叉性中和抗体価をハイスループットで調べるための技術を開発する。また、現行ワクチン接種者や自然感染者での、血清中の抗HPV16及び18抗体価を簡便に測定する方法を確立する。

現在、HPV感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることから、本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、これまでの3次元培養法ではHPV粒子を大量に安定して供給することはできない。これを可能にする平皿培養細胞を用いた技術開発を進めた。

HPV 既感染者への治療ワクチンを開発する。HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (乳酸菌E7ワクチン: GLBL101c) をGMP製造した製剤を作成し、第I/IIa相探索的臨床試験を計画に従って進めた。今年度はdose-escalation試験より推定された至適投与量(1g/日)を7症例に投与し登録を終了した。末梢血および病変部の生検組織より特異的細胞性免疫誘導能を解析し、組織診、

細胞診による病理学的評価との関連を解析した。

E6の機能の大部分は、p53など標的蛋白質のユビキチン-プロテオソーム系による分解に依存している。そこでプロテオソーム阻害剤であるMG132内包化ナノミセルを共同開発し、腫瘍への薬剤集積性や抗腫瘍効果を種々の子宮頸がん細胞株を用いて解析した。また、E6,E7に標的としたsiRNAのノックダウン効果と特異性を落とさずに細胞毒性を減らすため、DNA-RNAハイブリッド型核酸の改良を進めた。

HPV複製機構の解明と複製阻害剤開発のため異なる位置や方向でレポーター遺伝子を搭載した環状HPVゲノムを複製・維持する細胞株を樹立し、ゲノムコピー数とレポーター遺伝子の発現量を解析し、複製阻害剤の効果を評価できる系を作成した。

(倫理面への配慮)

臨床試験、臨床検体の解析においては「臨床研究に関する倫理指針」に則り、施設の研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントの上で、文書で同意を得た症例に対して研究を実施した。また、プライバシーの保護に万全を期し、提供試料、個人情報情報を厳格に管理・保存している。組換えウイルスの作成にあたっては、「カルタヘナ法」に則り、大臣確認、実施機関の承認の上実施した。動物実験は、5Rの精神に則り、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年6月改正）」、「実

験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」、内閣府告示の「動物の処分方法に関する指針」を踏まえ、適切に行なった。

C. 研究結果

1). 次世代感染予防ワクチン

現行の第一世代HPV感染予防ワクチンは型特異性の高いL1蛋白質を抗原とするため、子宮頸がんに対してはほぼ16、18型に限定した予防効果しかない。HPV型間で共通性の高いL2蛋白質を抗原とするワクチン抗原は、全ての発がん性HPVの感染予防効果を期待できる。神田班の成果であるこの第二世代HPV L2 56/75-VLPワクチンの製品化を目指し、2010年10月 武田薬品工業（株）による事業化が進められている。当研究班では、実用化を促進するために有効性を示す科学的根拠の蓄積と有効性を評価するための技術開発を進めている。ワクチン抗原に使われているHPV16 L2の56/75領域には、少なくとも2つの交叉性中和エピトープ（13B、24B）があることがわかり、これらのエピトープを認識する抗体は、複数の動物種で誘導されることを確認した。そのうち、24Bエピトープを認識するモノクローナル抗体は、調べたすべての高リスク型HPVを中和したが、13Bエピトープの抗原呈示法はさらに改良できる可能性が示唆された。一方、ヒトでの交叉性中和抗体価をハイスループットで調べるための技

術を開発し、特許出願している。HPV DNA検出用PCRプライマーの特性を調べ、56/75-VLPワクチンの有効性判定に用いるHPV検出法の選定に役立てた。現在、これまでに得られた結果をもとにワクチン抗原の更なる改良を目指している。また、現行ワクチン接種者や自然感染者での、血清中の抗HPV16及び18抗体価を簡便に測定する方法を確立した。これらは、L2 56/75-VLPワクチンの臨床試験において不可欠な技術である。

2) 経口治療ワクチン

HPV16のE7を抗原とする経口治療ワクチンは腸管免疫が子宮頸部へのCTL誘導に有効であるとの基礎研究の結果からもその有効性が期待されている。HPV HPV16型のE7蛋白質を菌体表面に提示する乳酸菌死菌製剤 (GLBL101c) を CIN3 患者に対して経口投与により、E7 特異的 CTL を誘導し子宮頸部の前がん病変治療を目的とする探索的 第 I/IIa 相臨床試験を 3 年間にわたり実施した。今年度は 7 症例を追加し臨床試験を終了した。予想された通り CIN3 患者全 17 例に対し、全ての用量で有害事象はなく、CIN3 病変の退縮も観察されている。子宮頸部粘膜リンパ球への抗 E7 細胞性免疫誘導の最大有効量 (1g/日) における奏効率(CIN3 退縮率)は 80%(8/10)であった。退縮後の CIN3 への増悪も観察されていない。集めた検体の病理、免疫学的解析からもその有効性と免疫反応との間の相関が確認されている。これは、経口薬により CIN3 に対する治療効果を示した世界初の成果である。

3). HPV 粒子産生

これまで、HPV 感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることから、本物の HPV 粒子を用いる必要がある。しかし、これまでの方法では HPV を培養技術で大量に安定して供給することはできない。今年度は、異なる型の HPV ゲノムを持つ表皮角化細胞から 3 次元培養により分化誘導により安定してウイルス粒子を作成する技術を開発し、抗体の中和活性測定に使用できることを確認した。また、不死化正常角化細胞株を用いて平皿培養において HPV ゲノムを安定して維持する細胞株を樹立し、薬剤添加により HPV ゲノムを 100-1000 倍に増幅させると同時に、分化誘導により L1, L2 蛋白の誘導にも成功した。L1, L2 蛋白の誘導には後期プロモーターと考えられる p670 (HPV16) から転写誘導に加え、細胞分化に高度に依存することを見出した。これにより平皿上での HPV 粒子産生の目的が立った。

4). HPV 複製阻害剤スクリーニング系の開発

独自に開発した遺伝子組換え HPV ゲノムを複製維持する細胞株の簡便な樹立法を用い、HPV16 及び 18 の複製における制御遺伝子の機能解析の結果、感染後の初期複製ならびにウイルス粒子産生時の後期複製にはウイルスがコードするヘリケース E1 が必須であるものの、未分化基底細胞における維持複製には必要ないことを明らかにした。本成果はこれまで米国などで開発中の E1 阻害剤は HPV 病変の

完治にはそれほど期待できないことを示しており J. Virol 誌の Spotlight にも取り上げられた。同じ技術を用い L1,L2 領域に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した HPV ゲノムを複製する角化細胞株の樹立に成功した。この細胞株は HPV 複製コピー数をほぼ同時にモニターすることができるため、HPV 複製阻害剤スクリーニング系に用いることが可能である。一方、E7 がウイルス生活環と細胞増殖性維持に重要であること、E6 がゲノムコピー数の維持に関与すること、E7 による上皮過形成誘導機構には JNK の活性化が重要であることを見出した。

5). ウイルス遺伝子を標的とした予防と治療

従来報告に反し HPV 維持複製には E1 が不要であるとの結果より、ウイルスがコードする唯一の酵素である E1 ヘリケースを標的とした維持複製阻害剤の開発は困難と判断した。一方、E6, E7 を標的とする薬剤などは子宮頸がんの治療に有効であるだけでなく、CIN 病変を対象にした予防治療に有効である可能性が高い。これまでに、HPV16 E6E7 を標的とした特異性の高い siRNA 配列をもとにオフターゲット効果や細胞毒性を下げつつ、サイレンシング効果を維持した核酸医薬として、RNA の一部を DNA に置き換えた dsRDC と idRNA を開発した（特許出願中）。これらを封埋したミセルの開発も片岡一則博士ら研究協力者と共に進めている。

6). ウイルス蛋白質を標的とした予防・治療法の開発

E6 はプロテオソーム系を用いて p53

などの分解を促進している。プロテアソーム阻害剤である MG132 封埋ミセルは MG132 単独投与に比べ子宮頸癌由来の細胞株である HPV18 型陽性の HeLa および HPV16 型陽性の CaSki 細胞移植マウスに対して、著明な抗腫瘍効果を示したことから、既に臨床使用が認可されているプロテアソーム阻害剤であるベルケードを用いた臨床試験を目指し、先行臨床研究の解析とともに、マウス Xenograft モデルを用いた前臨床試験を始めた。一方、腫瘍への効率のよい薬剤集積を目指して DDS の開発を進めた。プロテアソーム阻害剤による抗腫瘍効果発現のメカニズムには、E6 が標的とする癌抑制蛋白の分解抑制が関与している可能性が示唆された。

D. 考察

子宮頸がんは、我が国で年間約 15,000 人が発症し、約 3,000 人が死亡している。出産・育児世代の女性が多く罹患することから英語圏では「マザーズ・キラー」とも呼ばれている。実際、我が国では HPV 感染の低年齢化と 40 歳以下の子宮頸がん罹患率増加が続いており、HPV 感染予防ワクチンの重要性が増している。全ての発がん性 HPV 群に有効な感染予防ワクチンは将来の子宮頸がんの発症を激減させ、集団検診の負担を軽減する。武田薬品工業（株）による第二世代 HPV ワクチンの事業化が決定されたことにより、製品化を目指した臨床試験への目途がついた。臨床試験においては必須となる信頼できる多検体の中和

抗体測定法を開発、特許出願した。

また、L2 中和抗体による感染防御効果は当初の予想以上に高いことが判明しつつあるが、その機構には不明な点も多い。真の中和活性評価や感染機構の解析に必須の野生型の HPV 粒子や特定の遺伝子に欠損や変異を持った HPV 粒子の新たな産生法の目途が立った。HPV 粒子の大量安定供給により完成防御機構の解明とワクチン抗原の改良につながることを期待される。長期的には発展途上国でも投与可能な安価な感染予防ワクチンの開発が望まれる。L2 中和抗体エピトープの同定や感染防御機構解明により、これまで失敗に終わっている L2 ペプチドワクチンなどについても抗原、投与方法などを改良し再評価を開始したい。

一方、感染予防ワクチンは HPV 既感染者に対して治療効果はない。既感染者に対しては、定期受診によるフォローアップと病変進行時の外科的治療が行われている。潜伏感染している HPV ゲノムの複製阻害や被感染細胞の排除は、HPV 既感染者の発がんリスクを低下させる唯一の方法であるが、現在 HPV を排除する内科的治療法はない。HPV 治療ワクチンや HPV ゲノム複製阻害剤は CIN3 患者さらには子宮頸がん患者に対する、現在の外科的治療に取って替わる可能性がある。

内科的治療法は、患者への負担が少なく、頸管部を正常に保ち、患者の妊娠・出産に対する影響もない。経口 HPV 治療ワクチンは製造工程の容易さから低価格で製造が可能であり、HPV ゲノム複製阻害剤とともに

に成功すれば医療経済効果は高く、発展途上国への医療援助も可能である。このような内科的治療法が確立すれば、患者は定期受診による肉体的および精神的負担から解放され、医療負担も軽減される。この中で、HPV 複製阻害剤の開発につながるアッセイ系が樹立され標的とすべきウイルス分子も特定が進んでいる。今後はアッセイ系を単純化しハイスループット化を進める。また、HPV HPV16 型の E7 蛋白質を菌体表面に提示する乳酸菌死菌製剤 (GLBL101c) を CIN3 患者に対して経口投与により、E7 特異的 CTL を誘導し子宮頸部の前がん病変治療を目的とする探索的 I/IIa 相臨床試験を3年間にわたり実施し終了した。CIN3 患者全 17 例に有害事象は発生せず、子宮頸部粘膜リンパ球への抗 E7 細胞性免疫誘導の最大有効量 (1g/日) を見だし、奏効率(退縮率)は 80%であった。経口薬により CIN3 に対する治療効果を示した世界初の成果である。さらに、アジュバント併用の有用性、乳酸菌・HPV 分子の量比の再検討等による改良を非臨床で進め、第二世代乳酸菌経口薬を製剤化し研究期間内に臨床試験の実施をめざす。一方で、CIN3 病変や子宮頸がんは宿主免疫反応を逃れて進展した病変であり今回の経口治療ワクチン単独では CIN 病変の消失までは期待できないことも明らかとなった。そこで、CIN1/2 病変の排除も期待できる HPV16 の E2 を抗原とする経口治療ワクチン開発を開始することにした。

E6,E7 の高発現は CIN3 以上の病変

の維持に必須であることから siRNA やプロテオソーム阻害剤による E6,E7 の機能抑制による予防・治療法の開発を進めている。プロテオソーム阻害剤 (MG132)封埋ミセルは子宮頸がん細胞株 Xenograft に対し、腫瘍に集積する傾向を示し著名な抗腫瘍効果を観察しているが、製剤化には時間がかかるため既に臨床利用が認可されているベルケードを用いた臨床試験を優先する。siRNA の一部を DNA に置換した dsRDC や改良型の idRNA は細胞毒性が低く安定性が高いことが示されたが現状では DDS の開発に待つところが大きい。

E. 結論

本研究班では新たなシーズ開発を目指した基礎研究から臨床応用へ向けたTRまでを2名の婦人科臨床医、4名のウイルス学者と基礎研究者で構成し複数の共同研究により有機的に進めている。TRとしてはHPV型間で共通性の高いL2蛋白質を抗原とするワクチン抗原をもつ第二世代HPV感染予防ワクチンは、製薬会社により事業化され、製品化を目指した大規模臨床試験に必要な検査法などを開発整備している。また、HPV感染の正確な中和活性評価や感染中和機構の理解とその応用には必要な本物のHPV粒子を、簡便かつ大量に産生する技術開発は予定通り順調に進んでおり研究期間内の達成も期待できるところとなっている。一方、HPV16 E7を抗原としCTL誘導によるCIN3病変の治療を目指した経口治療ワクチンは探索的第I/IIa

相臨床試験を終了し、CIN3からCIN2への退縮と外科的手術の回避を80% (8/10)で観察し有望な結果を得ている。今後は、ワクチンのさらなる改良と共に、研究期間内の大規模臨床試験への橋渡しを目指している。プロテオソーム阻害剤によるE6の機能抑制は子宮頸がんの治療に有効であることが動物実験で示されつつある。ミセル化など投与法の改善には時間がかかるが、ベルケードなど承認薬を用いた早期の臨床試験開始を目指している。

また、米国などでは有望なHPV複製阻害剤としてシード化合物が取られているE1阻害剤は、持続感染病変に対して無効であり、複製阻害の標的遺伝子(産物)として不適であることを示し、HPV複製阻害剤の開発に必要なハイスループットのスクリーニング系の樹立が順調に進んでいる。HPV特異的mRNAを標的とする核酸医薬は理論的には特異性も高く効果も期待されるが、早期の臨床試験にはハードルが高く、地道な基礎研究とDDSの開発が必須な状況である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, and Kiyono T. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86:3276-3283, 2012.

Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, and Kiyono T. A critical role of MYC for transformation of

human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis* 33:910-917, 2012.

Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, and Kiyono T: Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology*.422:99-104, 2012.

Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T, Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach. *The Open Virol J*, in-press, 2012

Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2012

Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraie O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraie H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y, Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. *Oncol Rep*, E-pub, 2012

Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraie O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN. *Am J Reprod Immunol*, E-pub, 2012

Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S; Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune response to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with Lactobacillus-based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner. *Vaccine*, 30:

5368-5372, 2012

Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*, 84: 1128-1134, 2012

Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study. *Int J Clin Oncol*, 17: 233-239, 2012

Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japan: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012

Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H.: Productive lifecycle of human papillomavirus that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* 3: 152, 2012

Kondo K, Uenoyama A, Kitagawa R, Tsunoda H, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Kanda T, Kukimoto I. Genotype distribution of human papillomaviruses in Japanese women with abnormal cervical cytology. *Open Virol. J.*, in press.

Nakao S, Mori S, Kondo K, Matsumoto K, Yoshikawa H, Kanda T. Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2. *Virology*. 2012 434: 110-7

Kitamura-Muramatsu Y, Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Mori S, Saito S, Tsukahara Y, Kukimoto I. Novel Multiplexed Genotyping of Human Papillomavirus Using a

VeraCode-Allele Specific Primer Extension Method. Microbiol Immunol. 2012 56: 128-33

Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O, Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. Oncol Rep. 29(1):51-7, 2013.

2. 学会発表

Tomomi Nakahara, Katsuyuki Tanaka, Shin-ichi Ohno, Nagayasu Egawa, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono A cellular factor involved in suppression of E1-dependent replication of Human papillomavirus type 16 (HPV16) in proliferating keratinocytes. 28th International papillomavirus conference 2011, (Puerto Rico).

Kawana K, Current issues and future for prophylactic and therapeutic HPV vaccines, 第10回日本臨床腫瘍学会ワークショップ、7月、大阪

川名 敬、性感染症に対する粘膜免疫を介したワクチン開発、第16回日本ワクチン学会、11月、東京

Kawana K, HPV-associated cancer and development of a novel anti-cancer HPV therapeutic vaccine; 19th International Charles Heidelberger Symposium, Feb, Kagoshima

川名 敬、HPV に対する腸管粘膜免疫を介した子宮頸癌治療ワクチンの開発、日本薬学会 133 年会、3月、横浜

森清一郎、松尾理加、石井克幸、近藤一成、柗元 巖、Virus-like particleを用いた新たなHPV16/18抗体価測定系の確立、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆

正、柗元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

神田忠仁、森清一郎、柗元 巖、HPVワクチン - 有効性と残された課題、第60回日本ウイルス学会学術総会（大阪）

石井克幸、中原知美、森清一郎、竹内隆正、柗元 巖、神田忠仁、Trappc8はヒトパピローマウイルスの侵入に必要な宿主蛋白質である、第85回日本生化学会学術大会（福岡）

Iwao Kukimoto, Tomohiko Maehama, Seiichiro Mori, Rika Kusumoto-Matsuo, Kazunari Kondo, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. A novel method to determine the full-genome sequence of human papillomavirus type 16 using full-circle PCR followed by deep sequencing. 28th International Papillomavirus Conference (Puerto Rico)

Yoshiyuki Ishii, Tomomi Nakahara, Shiho Demoto, Seiichiro Mori, Takamasa Takeuchi, Iwao Kukimoto, and Tadahito Kanda. Identification of Trappc8 as a host factor that is required for human papillomavirus entry. The DNA Tumour Virus Meeting 2012 (Montreal) 梶谷直子、川手章史、酒井博幸：HPV 18E1[△]E4 の新規機能の探索：ビメンチンとの相互作用。第71回 日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月

梶谷直子、川手章史、酒井博幸：HPV 18E1[△]E4 の新規機能の探索。第60回 日本ウイルス学会学術集會、大阪、2012年11月

(2) Kenji Yamato, Shinji Endo

Identification of a short RNA segment in the
siRNA seed region required for efficient RNAi
第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年
12 月 博多

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特許出願番号 PCT/JP2010/052556

名称：プロテアソームインヒビター内包高
分子ミセル出願者：東京大学、 発明者：
片岡一則，西山伸宏，CabralHoracio，宮
本雄一郎，中川俊介，松本陽子

特許出願番号 2010-291067 ヒトパピローマウ
イルス(HPV)L2 蛋白質を認識するモノクロー
ナル抗体とそれを使用した HPV 中和抗体価
測定法 発明者：森清一郎他

特許出願番号 2011-268252 遺伝子発現阻害
剤及び阻害方法 出願者：(株) バイオシン
クタンク、 発明者：大和建嗣、名取幸和

特許出願番号：特願 2012-138943 「粘膜免
疫賦活化剤及びHPV感染症治療用経口医
薬組成物」出願日：2012/6/20 出願人：国
立大学法人東京大学 発明者：川名敬他

Ⅱ 分担研究者報告書

1. HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究
清野 透
2. HPV 治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究
川名 敬
3. HPV がん蛋白質の機能解析並びにウイルス増殖機構の解析
酒井 博幸
4. 交叉性中和抗体による HPV 中和の分子機構の解明と中和活性測定法の確立
森 清一郎
5. ナノミセルをもちいた HPV をターゲットとする新規治療法の開発
中川 俊介
6. 子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発に関する研究
大和 建嗣

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究

分担研究者 清野 透 国立がん研究センター研究所ウイルス発がん研究分野 分野長

研究要旨 正常ヒト子宮頸部角化細胞において環状HPV16ゲノムを細胞当たり約50コピーで安定に複製維持する細胞に外来性E1とE2の発現を薬剤により誘導できる細胞集団より複数の細胞株をクローニングにより得た後、解析を進めた。ドキシサイクリンの添加によりHPV16ゲノムのコピー数が細胞当たり約1万コピーに増幅した。さらにCa添加による分化誘導によりL1とL2の発現が確認された。ゲノム増幅と分化誘導の条件を至適化することで平皿培養細胞から成熟HPVゲノムを精製したが、感染性を確認するには至らなかった。しかし、ヒト正常角化細胞の単層培養よりHPV粒子を簡便に大量調製できる可能性が示唆された。ゲノム増幅の際、ATMの活性化とNFκBの活性化が認められ、これらがゲノム増幅を抑制していること、NFκBの活性化を阻害することでさらにコピー数を増加できることを見出した。

A. 研究目的

これまで、HPV感染の中和活性評価には偽ウイルス粒子が使われてきた。しかし、本物のウイルス粒子とは挙動が異なることが複数のグループより報告されており、中和活性を正しく評価するためには本物のHPV粒子を用いる必要がある。しかし、HPVは角化細胞の分化に伴いゲノムを増幅したのち分化に伴う後期遺伝子の発現誘導によりパッケージングされることから、*in vitro*における再現は困難である。従来の方法では、安定供給の難しい初代ヒト角化細胞にHPVゲノムを導入した後、3次元培養により角化細胞の分化を誘導することにより少量のウイルス粒子を回収できることが報告されているにすぎない。本研究においては不死化したヒト正常角化細胞

で環状HPVゲノムを安定して維持する細胞株の樹立とともに、平皿培養においてHPVゲノムを増幅、パッケージングさせる技術を開発する。それにより、中和活性評価や感染機構の解析に必須の本物のHPV粒子を安定供給する。また、HPVゲノムの複製機構を明らかにし、複製阻害により被感染細胞を排除する有効な新しい戦略を打ち立てる研究基盤を確立する。

B. 研究方法

昨年度までに、環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株において、外来性にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導できる細胞集団の作製に成功している。E1単独、E2単独、E1+E2の発現誘導により環状HPVゲノムの増

幅が見られるかを検討した。さらに平皿培養細胞より成熟ウイルス粒子の産生を試みた。

また、昨年度までに野生型ならびにE1発現欠損HPV16ゲノムを不死化皮膚角化細胞内で複製する細胞株を樹立している。これら2つの細胞株におけるHPVゲノムの維持複製ならびに分化誘導時における後期複製を比較した。

一方、E1とE2の発現誘導に加えCa添加により角化細胞の分化を誘導すると、ゲノムコピー数の増加と共に、複製ゲノムからのL1とL2の発現が確認された。密度勾配遠心法により成熟ウイルス粒子と思われる分画を精製し、ウイルスDNAの検出により回収ウイルス粒子量を推定した。

さらに、HPV複製阻害剤のスクリーニングを簡易に行うために、レポーター遺伝子を搭載したHPVゲノムを種々作製し、それらの有用性について検討した。HPVゲノム後期遺伝子コード領域内の様々な部分を分泌型ルシフェラーゼ発現カセットと置換したHPVゲノムを作製し、皮膚及び子宮頸部由来の角化細胞に導入後、ゲノム複製効率とレポーター遺伝子の発現量について検討した。

(倫理面への配慮)

手術材料よりの細胞の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得たものを用いている。また、使用にあたっては細胞名を符号化することにより患者のプライバシーの保

全に万全を期している。

C. 研究結果

環状HPV16ゲノムを安定に複製維持する不死化正常子宮頸部角化細胞株にE1とE2の発現をドキシサイクリン添加により誘導すると、ゲノムは24時間以内に細胞あたり約50コピーから1万コピー以上に増幅した。しかし、E1とE2の発現誘導後にはATMの活性化やNFκBの活性化と共に細胞増殖抑制が誘導された。ATMのノックダウンあるいはNFκB活性化を抑える野生型IκBや分解抵抗性のIκBを高発現させるとゲノムコピー数は更に約2倍以上増加することが示された。E6の発現によるp53の不活化やp53のノックダウンでは、ゲノムコピー数の増加は認められなかった。また、E1単独の発現誘導でもATMの活性化とNFκBの活性化が見られたがゲノムコピー数の増加はほとんど見られなかった。

E1とE2の発現誘導とCa添加によって分化誘導した角化細胞からウイルス粒子分画を回収し、HeLa細胞へ感染したが、感染成立に伴うE1/E4 mRNAの発現は確認できなかった。

一方、HPV複製阻害剤のスクリーニングに有用なレポーター遺伝子搭載HPVゲノムを作製した。このレポーターHPVは、角化細胞内で野生型と同様の効率で維持複製し、培養上清のルシフェラーゼ活性測定により、ゲノムコピー数の変化を容易にモニターすることができた。

D. 考察

不死化角化細胞の平皿培養系においてE1,E2の発現誘導によりHPVゲノムが数千倍に増幅可能な細胞集団を樹立し、その中から増幅効率の高いクローナルな細胞株を複数樹立した。これらの細胞株に、E1,E2の発現誘導に加え、Ca添加による角化細胞の分化誘導を組み合わせることにより複製された内在性ゲノムからL1とL2の発現が確認された。これまでL1とL2の発現誘導は3次元培養を用いなければ不可能だと考えられていたが、Ca添加によりスフェロイド形成が見られることから、スフェロイド形成時にL1とL2の発現が良く見られる傾向が観察された。これらの細胞より密度勾配遠心法により、HPVゲノムDNAを含む成熟ウイルス粒子分画を精製できたことから、平皿培養系から真の成熟HPV16ウイルス粒子を産生できる可能性が高まった。今後、L1とL2をより高発現する分化誘導条件の至適化などを行い、感染性を有した成熟ウイルス粒子の精製法を確立し、平皿培養からの大量安定産生技術を確立したい。

一方HPVの複製阻害剤はCINの治療薬あるいは子宮頸がんの予防薬として期待できる。昨年度の研究結果より、E1阻害剤を用いたとしても、ウイルス感染時の初期複製と粒子形成に至るウイルス増殖期の複製を阻害できるものの、持続感染病変の基底細胞における複製を抑制し被感染細胞を排除することは理論的に困難であることが示された。従って、E1阻害剤に拘ら

ず、広くHPV複製を阻害する薬剤のスクリーニングが必要である。今年度はHPV複製阻害剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞株の作製に成功した。この細胞株はレポーターHPVゲノムのトランスフェクションから2-3ヶ月でゲノムコピー数が徐々に減少するため、長期間維持できない欠点がある。今後、薬剤耐性遺伝子を挿入することにより、レポーターHPVゲノムをより長期間安定に保持できる細胞株の樹立しより安定したスクリーニング系を確立したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Yamato K, Natori Y, and Kiyono T: The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol*.86:3276-3283, 2012.

Narisawa-Saito M, Inagawa Y, Yoshimatsu Y, Haga K, Tanaka K, Egawa N, Ohno S, Ichikawa H, Yugawa T, Fujita M, and Kiyono T: A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis*.33:910-917, 2012.

Egawa N, Kawai K, Egawa K, Honda Y, Kanekura T, and Kiyono T: Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus, HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53. *Virology*.422:99-104, 2012.

2. 学会発表

Tomomi Nakahara, Katsuyuki Tanaka,
Shin-ichi Ohno, Nagayasu Egawa, Takashi
Yugawa, Tohru Kiyono A cellular factor
involved in suppression of E1-dependent
replication of Human papillomavirus type 16
(HPV16) in proliferating keratinocytes. 28th
International papillomavirus conference 2011,
(Puerto Rico).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV 治療ワクチン臨床試験の実施に関する研究

研究分担者 川名 敬

東京大学大学院医学系研究科・生殖発達加齢医学専攻・

産科婦人科学講座・生殖内分泌学分野 准教授

研究要旨

本研究では、第I/IIa相探索的臨床試験によってHPV16型陽性の子宮頸癌前癌病変を有する症例に対しHPV16E7発現乳酸菌ワクチン（GLBL101c）を経口投与し、腸管免疫を介して子宮頸部への抗E7粘膜免疫誘導に成功した。至適用量を投与された10例のうち、8例において前癌病変の退縮が確認され、根治手術を回避できた。GLBL101cはウイルス癌蛋白質を標的分子とし、粘膜免疫を介した初の癌ワクチンであり、粘膜アジュバントの応用によって更なる効果向上が期待される。

A. 研究目的

子宮頸癌は、本邦で年間10000万人が罹患し、年間3500人が死亡している(1)。減少傾向にあった本邦の子宮頸癌の年齢調整死亡率はこの20年間は下げ止まっている。しかも20～30才代で罹患率・死亡率ともに増加している(2, 3)。子宮頸癌のほぼ100%が発癌性ヒトパピローマウイルス(HPV)に因る。発癌性HPVには15タイプあり、現行のHPV予防ワクチンは、そのうち2タイプを予防するだけである。HPV予防ワクチンでは子宮頸癌の40%は予防できない(4)。HPVウイルス蛋白質のうちE7は、癌形質の維持に必須で、子宮頸癌細胞で恒常的に強発現している癌抗原である。そこで抗E7細胞性免疫を利用した免疫療法が期待される。これまで世界で7つの臨床試験が実施されたが実用化に至ったものはない。

E7の筋注・皮下注による全身性免疫誘導では子宮頸部粘膜の抗E7細胞性免疫が不十分であったと考えられる。

子宮頸癌に対する既存の治療法として挙げられる子宮摘出では、妊孕能は断たれ、また前癌病変（CIN3）に対する既存治療法である子宮頸部円錐切除術では、その後の早産リスクが3倍近く高まり、術後の周産期予後が問題となる。

本研究では、HPV分子を標的にした子宮頸癌と前駆病変（CIN）に対する新規の分子標的治療薬を開発することをめざしている。本研究の特色は、HPV分子を標的として粘膜免疫を誘導して治療効果を得る経口薬という点である。またHPV分子のキャリアーとして、ヒトで食経験のある乳酸菌*Lactobacillus casei*を用いた。ウイルス分子を標的としているため正常細胞

への影響がなく臨床応用しやすい。

我々はHPVの癌蛋白質であるE7を標的にしたE7発現乳酸菌経口薬 (GLBL101c) を製造し、子宮頸癌前癌病変CIN3に対する治療を目的とした探索的第I/IIa相臨床試験を実施している。これは世界初の粘膜免疫を介した癌ワクチンであり、子宮頸癌前癌病変に対する治療薬である。

本年度は、GLBL101cの薬理効果と臨床効果を臨床試験の中から見出すことを主たる目的としている。さらに、その薬理効果である免疫誘導能を増強させるための粘膜アジュバントの併用、漢方薬の併用を検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1)HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (E7 発現乳酸菌ワクチン:GLBL101c)を GMP 製造した製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第 I/IIa 相探索的臨床試験を計画し、平成 21 年から、臨床試験が開始している。

GLBL101c は、最少量の 1cap/d から数例コホートを組みながら 6cap/d まで増量した。1日1回5日間を1クールとして、1, 2, 4, 8 週の4クール内服した。安全性とHPV16E7に対する細胞性免疫誘導能(末梢血リンパ球と子宮頸部リンパ球)を解析した。ここでCIN3 病変が粘膜病変であることから、粘膜免疫を優位に誘導できる経腸管投与を選択し、子宮頸部粘膜内の粘膜リンパ球における細胞性免疫誘導能をELISPOT法により検討した。

内服治療による臨床的有効性を検討するために、5、9週で細胞診を施行し、9週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。また PBMC、cervical lymphocyte を採取して E7 特異的 IFN γ 産生細胞、GranzymeB 産生細胞 (E7-CMI) 数を調べた。

これまでに1cap/日1例、2cap/日3例、4cap/日3例、6cap/日3例の計10例(4コホート)に対して試験を行った。さらに、至適用量と考えられた 4cap/日について7例を追加し、全10例で有効性を検討した。安全性、有効性について外部評価委員会の承認を得て、次のコホートで用量を増量していった。外部データセンターを設置し管理集計を行った。

CIN1 への退縮は CR、CIN2 への退縮は PR、CIN3 の不変は SD、浸潤癌への増悪は PD とした。

(2)E7 発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるために、粘膜免疫誘導能の増強を図る目的でアジュバント併用による相乗効果をマウスモデルで検討した。臨床応用されているアジュバントとして、漢方薬と alpha-GalCer の併用を考えた。

マウス実験により、GLBL101c に加え、漢方薬(補中益気湯)と alpha-GalCer を併用した経口投与を行った。1, 2, 4, 6 週の4クールで経口投与し、7週で腸管リンパ球と脾臓リンパ球を採取し、E7-CMI を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研